

SKRIPSI

**EFEK PEMBERIAN $AlCl_3$ PER ORAL TERHADAP MORFOLOGI JARINGAN
TULANG DARI TIKUS PUTIH JANTAN (*Rattus*
norvegicus) STRAIN WISTAR DEWASA**



PENULIS

Ameilia Anastasya Rahma Afizah

011911133013

PROGRAM STUDI KEDOKTERAN

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS AIRLANGGA

SURABAYA

2022

**EFEK PEMBERIAN $AlCl_3$ PER ORAL TERHADAP MORFOLOGI JARINGAN
TULANG DARI TIKUS PUTIH JANTAN (*Rattus
norvegicus*) STRAIN WISTAR DEWASA**



Penulis

Ameilia Anastasya Rahma Afizah
NIM : 011911133013

Pembimbing

Nurina Hasanatuludhhiyah, dr., M.Si.

Prof. Viskasari P. Kalanjati, dr., M.Kes., PA(K), Ph.D

PROGRAM STUDI KEDOKTERAN

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS AIRLANGGA

SURABAYA

2022

**EFEK PEMBERIAN AlCl_3 PER ORAL TERHADAP MORFOLOGI JARINGAN
TULANG DARI TIKUS PUTIH JANTAN (*Rattus***

***norvegicus*) STRAIN WISTAR DEWASA**

Skripsi

Untuk memenuhi persyaratan tahap sarjana Program Studi Kedokteran

Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

Penulis

AMEILIA ANASTASYA RAHMA AFIZAH

NIM. 011911133013

PROGRAM STUDI KEDOKTERAN

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS AIRLANGGA

SURABAYA

2022

LEMBAR PENGESAHAN

**EFEK PEMBERIAN AICb PER ORAL TERHADAP MORFOLOGI JARINGAN
TULANG DARI TIKUS PUTIH JANTAN (*Rattus
norvegicus*) STRAIN WISTAR DEWASA**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi S1 Kedokteran di
Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga**

Oleh :

**Ameilia Anastasya Rahma Afizah
NIM. 011911133013**

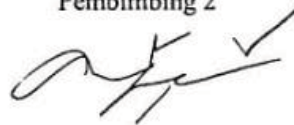
Menyetujui :

Pembimbing 1



**Nurina Hasanatuludhhiyah, dr., M.Si.
NIP. 198110062008012018**

Pembimbing 2



**Prof. Viskasari P. Kalanjati, dr., M.Kes., PA(K), Ph.D
NIP. 197603202005012003**

LEMBAR PENGESAHAN PENGUJI
EFEK PEMBERIAN ALCL₃ PER ORAL TERHADAP MORFOLOGI JARINGAN
TULANG DARI TIKUS PUTIH JANTAN (*Rattus*
***norvegicus*) STRAIN WISTAR DEWASA**
SKRIPSI

Oleh:

Ameilia Anastasya Rahma Afizah

NIM 011911133013

Disetujui dan diterima setelah diuji oleh Tim Penguji Program Studi Kedokteran
Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga

Surabaya, 12 Desember 2022

Menyetujui,

Ketua Penguji



Dr. Joni Susanto, dr., M.Kes. PA.
NIP. 196606151997021001

LEMBAR PERSETUJUAN

Skripsi ini telah diuji pada

Tanggal 28 November 2022

Pembimbing 1



Nurina Hasanatuludhiyyah, dr., M.Si.

NIP. 198110062008012018

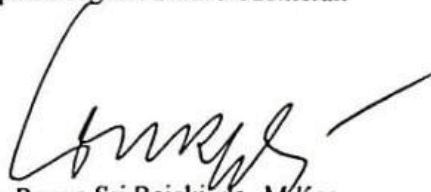
Pembimbing 2



Prof. Viskasari P. Kalanjati, dr., M.Kes., PA(K), Ph.D

NIP. 197603202005012003

Mengetahui,
Kepala Program Studi Kedokteran



Dr. Purwo Sri Rejeki, dr., M.Kes.

NIP. 197506122005012002

LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS KARYA ILMIAH

Yang bertanda tangan di bawah ini, saya :

Nama : Ameilia Anastasya Rahma Afizah
 Tempat, Tanggal Lahir : Ponorogo, 24 Mei 2000
 Alamat Tempat Tinggal : Dsn. Doyong, Ds. Ngampel RT 002 RW 00, Kec. Balong,
 Kab. Ponorogo, Jawa Timur
 Alamat e-mail : Ameilia.anastasya.r.a-2019@fk.unair.ac.id
 Nomor Telepon : 081249730725
 Judul Karya Akhir : Efek Pemberian $AlCl_3$ Per Oral terhadap Morfologi Jaringan Tulang dari Tikus Putih Jantan (*Rattus norvrgicus*) Strain Wistar Dewasa

Dengan ini saya menyatakan karya tulis ilmiah yang saya buat sebagai pemenuhan Modul Penelitian 2021/2022 adalah benar-benar hasil karya saya sendiri dan bukan plagiarism, bukan jiplakan karya orang lain dan belum pernah dipublikasikan dalam segala bentuk jurnal di manapun. Apabila di kemudian hari tulisan naskah saya tidak sesuai dengan pernyataan ini, maka secara otomatis naskah karya akhir saya dianggap gugur

Surabaya, 12 Desember 2022



Ameilia Anastasya Rahma Afizah

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kami panjatkan kepada Allah SWT, berkat rahmat dan pertolongannya, kami bisa menyelesaikan penyusunan skripsi dengan judul **“Efek Pemberian $AlCl_3$ Per Oral terhadap Morfologi Jaringan Tulang Dari Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*) Strain Wistar Dewasa”** dengan sebaik-baiknya. Tak lupa sholawat serta salam selalu tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW dan semoga kita semua mendapatkan syafa'atnya di hari akhir. Melalui skripsi ini, penulis berharap dapat berkontribusi dalam perkembangan ilmu kedokteran dan membawa kebaikan bagi umat. Dalam menyelesaikan skripsi ini, tidak terlepas dari peran orang-orang yang telah berjasa dalam memberikan dukungan serta arahan untuk penulis. Oleh karena itu, penulis ingin menghaturkan ucapan terima kasih kepada :

1. Selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan untuk penulis menempuh Pendidikan di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
2. Selaku Koordinator Program Studi Kedokteran Universitas Airlangga.
3. Selaku penanggungjawab Blok Penelitian yang telah memberikan arahan dan memfasilitasi penyusunan skripsi.
4. Nurina Hasanatuludhhiyah, dr., M.Si., selaku Pembimbing 1 yang telah memberikan arahan, bimbingan, dukungan, dan ilmu dengan ikhlas kepada penulis.
5. Prof. Viskasari P. Kalanjati, dr., M.Kes., PA(K), Ph.D, selaku Pembimbing 2 telah memberikan arahan, bimbingan, dukungan, dan ilmu dengan ikhlas kepada penulis.
6. Joni Susanto dr., M.Kes., yang telah memberikan arahan serta bimbingan dalam

penelitian sehingga penulis bisa menyelesaikan skripsi.

7. Pak Udin dan Pak Didik, selaku laboran yang membantu penulis dalam melakukan penelitian untuk skripsi.
8. Kedua orang tua yang tidak ada hentinya memberikan doa dan dukungan kepada penulis.
9. Teman-teman semua yang telah memberikan motivasi dan dukungan.
10. Serta semua pihak yang telah membantu penulis yang tidak bisa disebutkan satu persatu.

RINGKASAN

EFEK PEMBERIAN $AlCl_3$ PER ORAL TERHADAP MORFOLOGIJARINGAN TULANG DARI TIKUS PUTIH JANTAN (*Rattus**norvegicus*) STRAIN WISTAR DEWASA

Alumunium, salah satu unsur paling melimpah ketiga di alam merupakan logam yang memiliki toksisitas tinggi (Rodriguez dan Mandalunis, 2018). Toksisitas alumunium dapat masuk melalui rute oral, seperti makanan yang dikonsumsi sehari-hari, air minum, maupun pada obat kimia (Tietz *et al.*, 2019; Willhite, 2021). Selain rute oral, paparan alumunium juga dapat terjadi melalui kulit dari produk kosmetik maupun produk perawatan tubuh seperti antiperspiran, pasta gigi, dan tabir surya (Tietz *et al.*, 2019). Toksisitas akibat menghirup gas yang mengandung alumunium jarang terjadi, tetapi terkadang dapat ditemukan pada industri pengolahan alumunium (Hellstorm, 2006). Akumulasi alumunium terbanyak ditemukan pada jaringan tulang, khususnya di trabekula tulang dan saluran vaskuler (Rodriguez dan Mandalunis, 2018).

Pada orang yang sehat, kadar prooksidan dan antioksidan seimbang sehingga mencegah terjadinya stress oksidatif (Poprac *et al.*, 2017). Akumulasi alumunium akan mengganggu keseimbangan ini dengan meningkatkan *reactive oxygen species* (ROS) dan mengganggu aktivitas antioksidan sehingga mengakibatkan stress oksidatif dan apoptosis sel (Yang *et al.*, 2018). Pada tulang, timbulnya stress oksidatif menyebabkan ketidakseimbangan antara *bone resorption* dan *bone formation* sehingga proses remodeling tulang terganggu (Bonaccorsi *et al.*, 2018). Penelitian oleh Zhu *et al.* (2016), dengan menggunakan dosis 0,126 mg/ml pada tikus Wistar usia 3 hari,

didapatkan hasil bahwa AlCl_3 meningkatkan stress oksidatif dan penurunan sinyal Wnt/ β -catenin pathway (Zhu *et al.*, 2016). Dalam studi lain oleh Song *et al.* (2020), tikus yang diberi AlCl_3 secara oral dengan dosis 64/mg/hari selama 120 hari mengalami penurunan kepadatan mineral tulang di tulang belakang lumbar, metafisis femur, dan tibia (Song *et al.*, 2020). Dalam sebuah penelitian oleh Souza-Monteiro *et al.* (2021), dilaporkan bahwa intoksikasi AlCl_3 dengan dosis 8,3 mg/kg/hari selama 60 hari mengakibatkan penipisan tulang alveolar (Souza-Monteiro *et al.*, 2021).

Penelitian ini merupakan penelitian experimental dengan *posttest only control group*. Penelitian dilakukan dengan tiga kelompok perlakuan dengan randomisasi sederhana. Kelompok tersebut tersusun dari satu kelompok kontrol negatif, satu kelompok diberi perlakuan dengan induksi AlCl_3 sebesar 64 mg/kg/hari selama 67 hari lalu ditingkatkan menjadi 128 mg/kg/hari selama 20 hari dan satu kelompok diberi perlakuan dengan induksi AlCl_3 sebesar 128 mg/kg/hari selama 67 hari lalu ditingkatkan menjadi 256 mg/kg/hari selama 20 hari. Setelah perlakuan, tikus dikorbankan menggunakan etanol dan dilakukan dekapitasi. Tulang femur kanan diambil dan difiksasi dengan PBS formalin *solution* diikuti dengan dekalsifikasi dengan EDTA *solution*. Jaringan dipotong secara longitudinal setebal of 5 μ dan dilakukan pewarnaan dengan HE. Jaringan tulang diamati menggunakan Cell Sense *software* (Olympus, Japan) sebanyak 10 lapang pandang. Untuk menghitung kepadatan trabekula tulang, dilakukan pengambilan gambar dengan perbesaran 200x, kemudian di masking dengan menggunakan Adobe Photoshop 2018. Area trabekula tulang diukur menggunakan ImageJ 1.8.0. Rata-rata jumlah osteosit, osteoblas, dan osteoklas dari semua slide jaringan diambil dengan perbesaran 400x, kemudian dihitung menggunakan ImageJ 1.8.0. Data kemudian dianalisis menggunakan *software* SPSS versi 23.

Hasil yang didapatkan dari penelitian ini adalah sebagai berikut: 1) Osteoblas pada kelompok kontrol memiliki jumlah rata-rata inti sel tertinggi ($7,44 \pm 0,63$), diikuti oleh Al-2 ($6,56 \pm 0,65$), dan paling sedikit pada kelompok Al-1 ($5,56 \pm 0,47$). Perbedaan yang bermakna hanya ditunjukkan antara kelompok kontrol dan Al-2 ($p=0,026$); 2) Jumlah rata-rata inti sel osteosit paling sedikit pada kelompok Al-2 ($19,67 \pm 2,33$), sedangkan pada kelompok Al-1 dan kontrol masing-masing rata-rata jumlah inti selnya $24,00 \pm 1,40$; $27,56 \pm 1,83$, dengan nilai yang signifikan ($p=0,024$); 3) Rata-rata jumlah inti sel osteoklas paling tinggi terdapat pada kelompok Al-2 ($5,56 \pm 0,38$), bila dibandingkan dengan kelompok Al-1 ($3,67 \pm 0,41$) dan kontrol ($3,22 \pm 0,43$). Perbedaan bermakna ditemukan antara kelompok Al-1 dan Al-2 ($p = 0,003$); dan antara Al-2 dan kelompok kontrol ($p = 0,000$); 4) Kelompok kontrol memiliki kepadatan trabekular tertinggi ($0,26 \pm 0,01$) bila dibandingkan dengan kelompok Al-1 ($0,25 \pm 0,01$) dan Al-2 ($0,20 \pm 0,03$), meskipun perbedaan ini tidak signifikan secara statistik ($p=0,094$); 5) Populasi osteoblas terbukti memiliki pengaruh secara signifikan dengan jumlah osteoklas dalam kelompok Al-1 dan Al-2 ($p=0,49$; $p=0,038$, berturut-turut); 6) Rata-rata jumlah inti sel osteosit memiliki pengaruh signifikan pada kepadatan tulang kelompok Al-2 ($p = 0,038$).

Kesimpulan dalam penelitian ini adalah pemberian $AlCl_3$ menurunkan jumlah osteosit, namun meningkatkan jumlah osteoklas secara signifikan; dengan kecenderungan untuk menurunkan densitas diafisis trabekula yang berkorelasi dengan perubahan osteosit.

ABSTRACT

Aluminum contamination is often found in the daily life unintentionally, including in the drinking water and food appliances. Aluminum intoxication impairs the balance between reactive oxygen species (ROS) and the antioxidant levels, which produces an oxidative stress and apoptosis. In bone tissue, this has been reported to alter mineral deposition and cellular composition, although levels of gradually increased dosage and period of exposure have yet explored extensively. We examined later, using induced oral AlCl_3 on 27 male Wistar rodents aged 2-3 months. These animals were randomized equally into 3 groups, controls (placebo), Al-1 (oral AlCl_3 , 64 mg/kg of body weight/day for 67 days then the dose was doubled to 128 mg/kg of body weight/day for 20 days) and Al-2 (oral AlCl_3 , 128 mg/kg of body weight/day for 67 days then the dose was doubled to 256 mg/kg of body weight/day for 20 days). The means of osteocyte, osteoblast, osteoclast cell nuclei and diaphysis trabecular density of the right femur bone tissue were calculated from the longitudinal slices using Cell Sense, Adobe Photoshop, and ImageJ software after stained with HE. Data were analyzed using Kruskal-Wallis and one-way ANOVA, then used Mann-Whitney and LSD post-hoc tests to seek significant differences with significance level if $p < 0.05$. In Al-2, osteocytes was significantly lower than controls and Al-1 ($p = 0.024$), whereas osteoclasts was significantly higher than other groups ($p = 0.001$); although no significant effect on the osteoblasts was observed ($p = 0.102$), and the trabecular bone density in Al-2 also showed no significant effect compared to Al-1 and controls ($p = 0.094$). In this study, graded- and prolonged- oral AlCl_3 induction could cause impaired cellular components specifically to the osteocytes and osteoclasts, rather to the osteoblasts and bone diaphysis density.

Key words: Alumunium toxicity, Health risk, Environmental pollution, Bone tissue, Male Rats

DAFTAR ISI

SAMPUL LUAR	i
SAMPUL DALAM.....	ii
PRASYARAT.....	iii
LEMBAR PENGESAHAN	iv
LEMBAR PENGESAHAN PENGUJI.....	v
LEMBAR PERSETUJUAN	vi
LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS KARYA ILMIAH.....	vii
UCAPAN TERIMA KASIH	viii
RINGKASAN	ix
ABSTRACT.....	xiii
DAFTAR ISI.....	xiv
DAFTAR TABEL.....	xviii
DAFTAR GAMBAR.....	xx
DAFTAR LAMPIRAN.....	xxi
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	5
1.3. Tujuan Penelitian.....	6
1.4. Manfaat Penelitian.....	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1 Alumunium.....	9
2.1.1 Paparan Alumunium pada Tubuh Manusia	9
2.1.2 Toksisitas Alumunium pada Tulang.....	10
2.1.2.1. Efek Toksik Alumunium pada Sel Osteoblas Tulang.....	12
2.1.3. Gambaran Histologi Tulang dengan Toksisitas Alumunium	15

2.2. Tulang.....	18
2.2.1. Definisi Tulang.....	18
2.2.2. Klasifikasi Tulang	18
2.2.3. Sel-sel yang Ada pada Tulang.....	19
2.2.4. Gambaran Histologi Normal dari Tulang.....	22
2.3. Proses Remodeling Tulang.....	25
2.4. Penyakit-Penyakit pada Tulang Akibat Toksisitas Alumunium	27
2.4.1. Osteoporosis	28
2.7. Stress Oksidatif	34
2.7.1. Stress Oksidatif yang Diinduksi oleh Alumunium.....	35
2.7.2. Efek Stress Oksidatif pada Remodeling Tulang.....	36
2.8. Antioksidan	39
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN.....	42
3.1. Kerangka Konseptual Penelitian	42
3.2. Penjelasan Kerangka Konsep	43
3.3. Hipotesis Penelitian.....	45
BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN	47
4.1. Jenis dan Rancangan penelitian.....	Error! Bookmark not defined.
4.1.1. Jenis Penelitian	Error! Bookmark not defined.
4.1.2. Rancangan Penelitian	Error! Bookmark not defined.
4.2. Populasi, Besar Sampel, dan Teknik Pengambilan Sampel	48
4.2.1. Populasi	48
4.2.2. Besar Sampel	48
4.2.3. Kriteria Sampel.....	49
4.2.4. Teknik pengambilan sampel.....	49
4.3. Variabel Penelitian	49

4.3.3. Variabel Kendali.....	50
4.4. Definisi Operasional.....	51
4.5. Bahan Penelitian.....	53
4.6. Instrumen Penelitian.....	53
4.7. Lokasi dan Waktu Penelitian.....	54
4.7.1. Lokasi Penelitian	54
4.7.2. Waktu Penelitian	54
4.8. Prosedur Operasional Penelitian	54
4.8.1. Pembagian Kelompok	54
4.8.2. Induksi Alumunium.....	55
4.8.3. Prosedur Pengambilan Sampel untuk Pemeriksaan Morfologi Jaringan Tulang	55
4.9. Metode Penghitungan Kepadatan Tulang.....	56
4.10. Kerangka Operasional	60
4.11. Cara Pengolahan dan Analisis Data.....	62
4.12. Etik Penelitian.....	63
BAB 5_HASIL DAN ANALISIS PENELITIAN	65
5.1. Karakteristik Subyek Penelitian	65
5.2. Hasil Uji Statistik serta <i>Mean</i> Hitung Inti Sel Osteosit, Osteoblas, Osteoklas, dan Kepadatan Trabekula	65
5.3. Uji Statistik Perbandingan Hitung Inti Sel Osteosit, Osteoblast, Osteoclast, dan Kepadatan Trabekula Antar kelompok	66
5.4. Korelasi Antara Kepadatan Trabekula dengan Hitung Inti Sel Serta Hitung Inti Sel Osteoblas terhadap Hitung Inti Sel Osteosit dan Osteoklas	67
5.5. Gambaran Histopatologi Tulang Femur Kanan <i>Rattus norvegicus</i> dengan Pewarnaan HE ...	63
BAB 6 PEMBAHASAN.....	70
6.1. Efek Induksi $AlCl_3$ terhadap Hitung Inti Sel Osteoblas dan Osteosit.....	64
6.2. Efek Induksi $AlCl_3$ terhadap Hitung Sel Osteoklas	65
6.3. Efek Induksi $AlCl_3$ terhadap Kepadatan Trabekula Tulang.....	66

6.4. Uji Korelasi Regresi Linier Sederhana	67
6.5. Keterbatasan Penelitian.....	68
BAB 7 PENUTUP	71
7.1. Kesimpulan	71
7.2. Saran.....	72
DAFTAR PUSTAKA	73
LAMPIRAN.....	77

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1. Definisi Operasional	47
Tabel 5.1. Hasil Uji Statistik dan Analisis Deskriptif	60
Tabel 5.2. Hasil <i>Post-Test Mann-Whitney</i>	61
Tabel 5.3. Hasil Tes Regresi Linier Sederhana	62

DAFTAR BAGAN

	Halaman
Bagan 3.1. Kerangka Konseptual Penelitian.....	40
Bagan 4.1. Kerangka Operasional Penelitian.....	56

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Pasien dengan osteomalasia dengan dialisis ginjal	14
Gambar 2.2. Identifikasi histokimia Al dengan metode solochrome.....	15
Gambar 2.3. Identifikasi prosthesis pinggul yang ditutupi oleh mantel alumunium	15
Gambar 2.4. Identifikasi histokimia Al.....	16
Gambar 2.5. Gambar <i>primary center</i> dari ossifikasi.....	21
Gambar 2.6. Gambar tulang yang imatur (W), Dikelilingi oleh osteoblast (B), Tepi lamellar bone (L), Kanal harvers (H)	22
Gambar 2.7. Gambar osifikasi endochondrial	23
Gambar 2.8 Trabekula tulang yang berkontraksi dan berlubang	28
Gambar 2.9. Hilangnya tulang trabekular.....	28
Gambar 2.10. Trabekula tulang yang menipis dari seorang wanita berusia 70 tahun	29
Gambar 2.11. Osteoporosis pada tulang dengan anisotropi trabekula.....	29
Gambar 2.12. <i>Trabecular disconnection tendency</i> dan resorpsi endosteal	30
Gambar 2.13. Nekrobiosis dan retraksi myeloid di aerola tulang.....	30

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Lini Masa Kegiatan Penelitian	77
Lampiran 2 Sertifikat Laik Etik	78
Lampiran 3 Hasil Analisis Statistik.....	79
Lampiran 4 Hasil Masking Photoshop untuk Hitung Luas Trabekula	86

DAFTAR SINGKATAN

Al	= Aluminium
ALP	= Alkaline Phosphatase
BGP	= Bone Gla Protein
BMD	= Bone Mineral Density
BMU	= Basic Multicellular Unit
Ca	= Calsium
CaSR	= Calcium-Sensing Receptor
CAT	= Catalase
CTX-1	= Carboxy-Terminal Collagen Crosslinks
DAMPs	= Damage-Associated Molecular Patterns
DXA	= Dual Energy X Ray Absorptiometry
DNA	= Deoxyribonucleic Acid
EDTA	= Ethylene Diamine Tetra-Acetic Acid
EFSA	= European Food Safety Authority
GSH-Px	= Glutathione Peroxidase
JNK	= c-Jun N-Terminal Kinase
MDA	= Malondialdehyde
Mg	= Magnesium
NTX-1	= N-Terminal Telopeptides of Type I Collagen
OPG	= Osteoprotegerin
P	= Phosphor
PICP	= Procollagen I Carboxy Terminal Propeptide
PN	= Peripheral Neuropathy
PTH	= Parathyroid Hormone
PUFA	= Polyunsaturated Fatty Acids
RANK	= Receptor Activator of Nuclear Factor-KappaB
RANKL	= Receptor Activator of Nuclear Factor-KappaB Ligand
ROS	= Reactive Oxygen Species
SOD	= Superoxide Dismutase
TCF-1	= Transcription Factor-1
TCF	= T Cell Factor
TNF	= Tumor Necrosis Factor
TPN	= Total Parenteral Nutrition
TRACP 5b	= TArtrate-Resistant Acid Phosphatase
WHO	= World Health Organization